

研究成果報告書

所属機関
大阪公立大学

職名
准教授

氏名
尾島 由紘

研究テーマ

酵母細胞を鋳型とした水素発生反応用触媒の合成制御

研究報告

1. 研究の背景と目的

遷移金属リン化物(TMP)は、安価なコバルトやニッケルなどのリン化物で、水素発生反応等で用いられる白金族の代替として注目を集めるが、微小構造の変化で触媒性能が異なり反応機構に未解明な点が多い。さらにTMPは、製造過程においてホスフィンなどの危険で有害かつ爆発性のあるリン前駆体を使用するという問題点がある。2017年に海外の研究グループが、酵母と金属イオンを焼成すると細胞中のリンが反応し、「TMP粒子が分散された炭素複合材料」を合成できると報告した【Zhang, et al., J. Am. Chem. Soc., 139, 11248-11253 (2017)】。この触媒合成法において窒素雰囲気下で焼成された酵母細胞は多孔質炭素支持体となり、TMP粒子の分散を助ける。さらに水素発生反応時には導電性が電子移動を可能にし、不均一電気触媒としてそのまま使用できるなど酵母を支持体とする多くの利点がある。さらに安全安価な合成法だが、鋳型である酵母細胞は天然の状態で使用しており、細胞改変による合成制御アプローチは手つかずのままとなっている。一方、研究代表者はこれまで化学修飾もしくは遺伝子組換えを行い、リン酸やポリリン酸を高濃度で含有した酵母細胞の作製【Ojima, et al., Arch. Microbiol., 205(4), 138 (2023)】と、負電荷による金属イオンの吸着回収を報告してきた【Ojima, et al., Sci. Rep., 9, 225 (2019)】。また多重細胞壁や細胞壁脆弱性を持つ変異株も多数取得している。そこで本研究では、パン酵母のリン酸含有量を高めたリン蓄積酵母や細胞壁変異株を用い、リン化コバルト炭素複合体(CoxP-C)の新規作製方法の検討と触媒活性の向上を目指した(図1)。

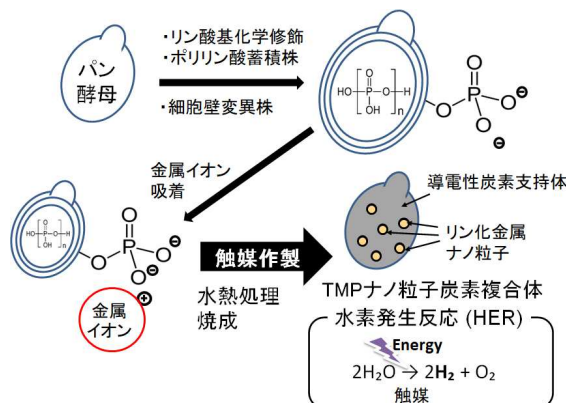


図1 酵母細胞を骨格にした触媒合成法

2. 研究成果および考察

1) リン酸修飾方法の検討とTMP合成ならびに触媒活性評価

リン酸修飾は食品添加物であるトリメタリン酸ナトリウムを用いた化学修飾と、遺伝子変異株がポリリン酸として蓄積する生理現象、の2つのアプローチで実施した。通常のパン酵母細胞のリン含有量が1-2wt%であるのに対して、化学修飾酵母は約3wt%に増加する。一方、リン酸蓄積酵母は培養液中のリン酸を高効率に取り込み、ポリリン酸の形態で液胞内に局在し蓄積するため、細胞質内に存在する遊離リン酸とは異なる反応が生じることが予想される。リン蓄積酵母の総リン量をICP発光分光分析により測定したところ、約8wt%となり化学修飾酵母よりも修飾効率が高かった。

市販ドライイースト由来のパン酵母と、化学修飾を施したリン酸化酵母、遺

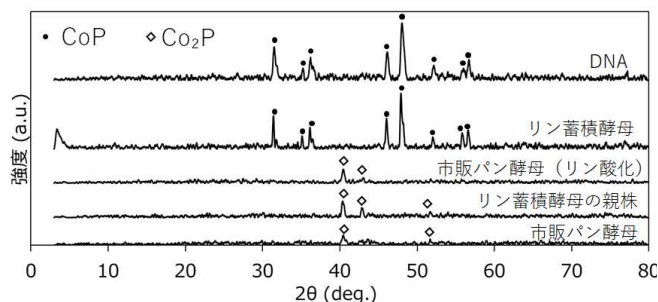


図2 作製した触媒の XRD 解析結果

伝子変異によりポリリン酸を蓄積するように改変したリン蓄積酵母を用いて、900℃でコバルトイオンと共に焼成し、リン化コバルト炭素複合体(CoP-C)を作製した。X線回折法(XRD)で解析したところ、大部分の条件では従来の報告どおりCo₂Pが生成したが、リン蓄積酵母を用いた場合のみ一部の焼成条件において結晶構造が異なるCoPが生成した(図2)。さらにリン蓄積酵母の焼成物をX線光電子分光法(XPS)により分析したところ、P 2pよりP-Coのピークが見られたことからリン化コバルトの結合が確認できた。また炭素マトリックス上にもリンや窒素、酸素がドーピングされていることが明らかとなった。CoPの合成に関しては、酵母細胞を用いた報告例はないが酵母から抽出したDNAを用いて合成した文献が存在したため、同様にDNAを用いて合成するとCoPが生成された。リン蓄積酵母を用いた実験において、焼成時間や窒素ガスの流速について検討したところ、焼成時間が短く、窒素ガスの流速が速いほどCoPが生成しやすい傾向があった。

続いて、リン蓄積酵母を用いるとCoPが生成した原因が、細胞内のリン酸量が多いためであるか調べるため、焼成時にパン酵母にリン酸を外部から添加したところ、Co₂PとCoPの混合物が生成した。この結果から、酵母細胞内のコバルトに対するリン量が一定以上になると一部CoPが生成することが示唆された。ただし、外部からのリン酸の添加量を増やしても純粋なCoPは得られなかった。一方で、リン蓄積酵母を用いても、溶媒をテトラヒドロフランから純水に変更した場合はCo₂Pのみが生成したことから、CoPの形成にはコバルトとリンの量比だけでなく、焼成前処理も重要であると考えられる。

次に、作製した触媒の水素発生反応における活性を調べた。一般にリニアスイープボルタンメトリー(LSV)による分極曲線では、低い電圧で電流が流れ始めたほうが水の電気分解が起きやすく触媒活性が高いとされる(図3)。リン蓄積酵母由来は、パン酵母由来の触媒よりも低い電圧で電流が流れ始めたことから、触媒活性が高かった。またDNA由来の触媒と同等であった。一方、パン酵母にリン酸を添加して焼成した触媒では、0.6 Mで添加した場合のみリン蓄積酵母由来の触媒と同等の結果となり、1.6 Mを添加した場合はかえって活性が低下した。

10 mA cm⁻²の電流密度における過電圧を触媒活性の指標として比較したところ、パン酵母由来の触媒は-330 mVであるのに対し、リン蓄積酵母由来の触媒は-192 mVであり、高い触媒活性を持つことが裏付けられた。またパン酵母に0.6 Mのリン酸を添加した条件とDNAを用いた条件では、それぞれ-197 mVと-198 mVとなり、リン蓄積酵母と同等の値であった。これらの結果から、Co₂PよりもCoPもしくはCo₂PとCoPの混合物のほうが水素発生反応において高い活性を持つ傾向が確認された。得られた触媒を透過型電子顕微鏡(TEM)で観察したところ、リン蓄積酵母ではリン化コバルトと思われる粒子量が多く、粒子径も大きい様子が確認された。以上の結果より、酵母細胞を骨格とした際にリン量が一定以上になるとCoP-Cが作製され、水素発生反应用触媒として機能することが確認された。

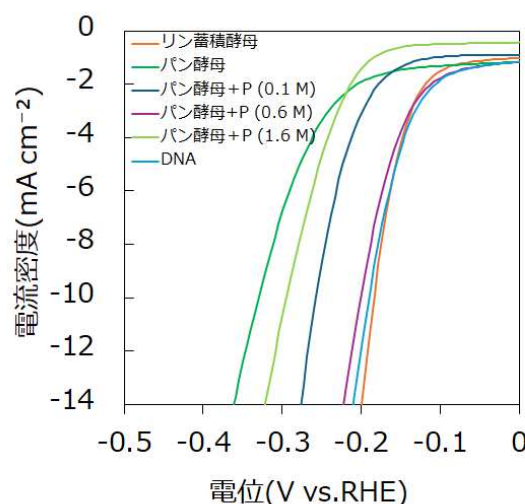


図3 各触媒の水素発生反応における LSV (5 mV s⁻²) の分極曲線

2) 酵母細胞の細胞壁改変と触媒合成ならびに評価

細胞壁改変では、細胞壁が多重となり厚くなる*slal*遺伝子欠損株や、逆に細胞壁が脆弱化し薄くなる*anp1*、*gup1*遺伝子欠損株を用いて触媒合成を実施した。これらの欠損株には、リン蓄積酵母ではなく、実験室株であるBY4741を用いた。厚くなる場合は、金属イオンの透過性が低下するが触媒合成の反応場が増加すると予想し、薄くなる場合は、反対の効果が生じると予想した。これら欠損株をバイオリアクターで培養した後に凍結乾燥し、コバルトイオンと共に焼成した。得られた触媒のXRD解析を行ったところ、どの欠損株においてもCoPとCo₂Pの混合物であることがわかった。続いて、同様に水素発生反応における触媒活性をLSVにより比較し評価した。10 mA cm⁻²の電流密度における過電圧値は、パン酵母が-330 mVであるに比べ、どの欠損株においてもそれと同等が少し高い値を示しており、触媒活性の向上は見られなかった。これらの結果から、細胞壁を厚くしても薄くしても触媒活性がやや低下した。従って触媒活性を向上する目的に対して、リン酸修飾のアプローチの方が効果的であることが明らかになった。

3. 将来展望

触媒活性を向上させる足掛かりとして、リン蓄積酵母を用いるとCoPが合成できることを明らかにした。そこで、今後はリン蓄積酵母において、合成条件をさらに検討する。特に焼成条件に関しては、焼成温度や焼成時間ならびに窒素供給の流速などを検討する。細胞壁改変のアプローチに関しては、実験室株を用いた場合には触媒活性を向上することはできなかったが、リン蓄積酵母をベースに細胞壁変異株を作製し再度検討する予定である。触媒活性が大幅に増加する合成方法を確立した後は、本技術の実用化に向けて、合成のスケールアップと触媒の安定性試験を実施する。スケールアップに関しては、現在は数百ミリグラムのオーダーで作製している触媒を数十グラムのオーダーで作製し、量産化できることを確認する。また安定性試験に関しては、水素発生反応における繰り返し使用を行い、安定性を白金族触媒と比較する。

微生物細胞を骨格とした触媒・材料合成に関しては、遷移金属リン化合物の他にも、遷移金属窒化物も報告されている【Li et al., *Small*, 16, 2001980 (2020)】。また次世代の2次電池として注目を集めるリチウム硫黄電池でも、マンガン吸着させた酵母を水熱・焼成処理した酸化マンガン炭素マトリックスを電池の正極と負極を隔てるセパレーターに用いた報告がある【Feng et al., *J. Alloys Compd.*, 817, 152723 (2020)】。本研究で得られた成果は、微生物細胞を骨格とした触媒・材料合成の研究分野に重要な知見を与えるものである。

4. 研究発表

学会発表

尾島 由紘, 秋吉 理穂, 東 雅之

「酵母菌体成分を骨格とする新規な触媒合成技術の開発」

化学工学会第89年会, H307, 堺, 2024年3月 (口頭発表)

その他発表

尾島 由紘

「酵母の細胞成分を骨格とする新規な触媒合成技術の開発」

大阪公立大学, イノベーションアカデミーワークショップ, 大阪, 2024年1月 (口頭発表)